

L20 ANSWER 1 OF 2 CAPLUS COPYRIGHT 2004 ACS on STN

ACCESSION NUMBER: 2001:194763 CAPLUS  
DOCUMENT NUMBER: 134:251205  
TITLE: Anti-cancer drug  
INVENTOR(S): Asano, Makoto; Tanaka, Ayako; Suzuki, Hideo  
PATENT ASSIGNEE(S): Toa Gosei Chemical Industry Co., Ltd., Japan  
SOURCE: Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 8 pp.  
CODEN: JKXXAF  
DOCUMENT TYPE: Patent  
LANGUAGE: Japanese  
FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1  
PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
JP 2001072589	A2	20010321	JP 1999-341598	19991201
PRIORITY APPLN. INFO.:			JP 1999-192106	A 19990706
AB	Provided are anti-tumor compn. comprising monoclonal anti-VEGF/VPF antibodies and taxanes (e.g. taxol derivs. or Docetaxel). These anti-VEGF/VPF monoclonal antibodies recognize >1 epitopes with sequences of KPSCVPLMR, SFLQHMKCECRP, or KCECRPKKDRAR.			
IT	319920-98-4 319920-99-5			
	RL: PRP (Properties)			
	(unclaimed sequence; anti-cancer drug)			

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-72589

(P2001-72589A)

(43) 公開日 平成13年3月21日 (2001.3.21)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	データベース* (参考)
A 6 1 K 31/337		A 6 1 K 31/337	4 B 0 2 4
39/395		39/395	T 4 C 0 8 4
45/00		45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/02	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A C
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 8 頁)			

(21) 出願番号	特願平11-341598	(71) 出願人	000003034 東亜合成株式会社 東京都港区西新橋1丁目14番1号
(22) 出願日	平成11年12月1日 (1999.12.1)	(72) 発明者	浅野 誠 茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式 会社つくば研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平11-192106	(72) 発明者	田中 綾子 茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式 会社つくば研究所内
(32) 優先日	平成11年7月6日 (1999.7.6)	(72) 発明者	鈴木 日出夫 茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式 会社つくば研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 制癌剤

(57) 【要約】

【課題】 新規な制癌剤の提供。

【解決手段】 抗VEGF/VPFモノクローナル抗体  
とタキサン系化合物を有効成分とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 VEGF/VPFアンタゴニストとタキサン系化合物を有効成分とすることを特徴とする制癌剤。

【請求項2】 VEGF/VPFアンタゴニストが抗VEGF/VPFモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1の制癌剤。

【請求項3】 抗VEGF/VPFモノクローナル抗体がVEGF/VPFのアミノ酸配列の一部である下記配列1～3の少なくとも1つと反応する抗体であることを特徴とする請求項2の制癌剤。

1. KPSCVPLMR
2. SFLQHNKCECRP
3. KCECRPKKDRAR

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血管透過性因子(VPF)〔血管内皮細胞増殖因子(VEGF)とも呼称されており、本明細書では「VEGF/VPF」と総称する〕アンタゴニストとタキサン系化合物とを併用した制癌剤、特に、癌細胞の増殖を抑える副作用の少ない制癌剤に関するものであり、医療、製薬技術に属するものである。

## 【0002】

【従来の技術】本発明者等は、先に、VEGF/VPFの機能阻害剤からなる腫瘍抑制剤についての提案を行い(特開平6-116163号)、さらに、腫瘍血管の新生を抑制することによって間接的に腫瘍の増殖を阻害するという作用機作と従来の腫瘍細胞そのものをターゲットとする抗癌剤との併用により、癌の化学療法がより効果的に行えることを見出し、VEGF/VPFアンタゴニストとシクロホスファミド、ビンクリスチンまたはミノサイクリンを併用した薬剤がより効果的に腫瘍の増殖を抑えることが出来ることを見だし併用薬剤の提案をおこなった(特開平10-114680、特願平10-129646)。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、先の提案を行うと共に、ビンクリスチンはチューブリンの微小管形成を阻害するビンカルカロイド系抗癌剤であり、広い概念では、有糸分裂阻害作用を有するものであるとされているため、それらに属する化合物、例えば、スルホンアミド系化合物(E7010)、コルヒチン類、ステガナシン類、コンプレスタチン類、ストレプトピロン、マクベシン類、ボドフィロトキシン類、ベンズイミダゾール類(Carbendazim)、メイタンシン類、リゾキシシン類、ドラスチン類、ホモプシン(Phomopsin)、ウスチロキシシン(Ustiloxin)、更には、ミノサイクリンはテトラサイクリン系抗菌抗生物質であるが、その作用として、血管新生阻害活性を有することが報告されていることから、TNP-470のようなフマギリン誘導体やMMP阻害

剤等の血管新生阻害剤、血管新生阻害活性を有するステロイド剤、サリドマイド、抗インテグリン抗体等の血管新生阻害活性を有する化合物等とVEGF/VPFの機能阻害剤との併用について検討を行い、併用により優れた抗癌剤が提供できないか研究を行ったのである。

## 【0004】

【課題を解決する手段】本発明者らは上記の様な各種の化合物とVEGF/VPFの機能阻害剤との併用について検討し、特定の化合物との併用において、格別に優れた効果が奏されることを見出し、本発明を完成したのである。すなわち、本発明はVEGF/VPFアンタゴニストとタキサン系化合物を有効成分とすることを特徴とする制癌剤、該VEGF/VPFアンタゴニストが抗VEGF/VPFモノクローナル抗体であることを特徴とする制癌剤および該抗VEGF/VPFモノクローナル抗体がVEGF/VPFのアミノ酸配列の一部である下記配列1～3の少なくとも1つと反応する抗体であることを特徴とする制癌剤に関するものである。

1. KPSCVPLMR
2. SFLQHNKCECRP
3. KCECRPKKDRAR

## 【0005】

【発明の実施の形態】VEGF/VPF(vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor)は、直接的に血管内皮細胞に作用し、血管新生すなわち毛細血管内皮細胞の増殖、移動および組織への浸潤という現象は胎児の生長、創傷治癒、癌細胞の増殖などの生理的または病理的現象において重要な役割を果たしているものである。

【0006】VEGF/VPFに関しては、マウス、ラット、モルモット、ウシ及びヒトの正常又は腫瘍細胞株で分泌されており、また組織別では脳、下垂体、腎臓、卵巣に存在することが明らかにされている[(Ferrara, N., et.al. Endocrine Reviews13:18(1992))]. ヒトVEGF/VPF遺伝子についてはそのcDNAがすでに単離されて塩基配列が決定され、アミノ酸配列も推定されている。この遺伝子からアミノ酸残基数の異なる4種類の蛋白(アミノ酸残基数が121個、165個、189個、206個の4種類)が作られ、それらの中で121個のアミノ酸残基数のもの(VEGF/VPF121)と165個のアミノ酸残基数のもの(VEGF/VPF165)が成熟蛋白であると言われている[(Ferrara N., et. al. Endocrine Reviews 13:18(1992))]. VEGF/VPF121はVEGF/VPF165のカルボキシル末端側の44個のアミノ酸が欠損したものであるが、VEGF/VPF121とVEGF/VPF165の間に、血管内皮細胞に対する作用の違いがあるかどうかについては明らかにされていない。

【0007】本発明において、VEGF/VPFアンタゴニストとは、上記のVEGF/VPFの作用を阻害す

る機能を有するものをさし、その機能を有するものであれば如何なる形態のものでよく、従来、血管内皮細胞培養系を用いたin vitro培養系およびin vivo血管新生モデルを用いて、血管新生を選択的に阻害する物質がスクリーニングされており、これまでに、例えば、プロタミン (Taylor, S. et al., Nature, 297, 307, 1982)、ヘパリンとコーチゾンの併用剤 (Folkman, J. et al., Science, 221, 71, 1983)、ブレドニゾロン・アセテート (Robin, J. B., Arch. Ophthalmol., 103, 284, 1985)、硫酸化多糖 (特開昭63-119500号公報)、ハービマイシンA (特開平63-295509号公報)、フマギリン (特開平1-279828号公報)、インターフェロン $\beta$  (国際公開第WO/29092号公報) 等が知られている。

【0008】本発明におけるVEGF/VPFアンタゴニストとして好ましいものとしては、VEGF/VPFに作用する抗体、またはその一部分が挙げられるが、それらに限定されることなく、例えば、VEGF/VPFの作用を阻害する不活性なVEGF/VPF、またはその一部分、VEGF/VPFの受容体の機能を損なう、例えば、血管透過性因子受容体に対する抗体、またはその一部分等を挙げることができる。VEGF/VPFに作用する抗体は、アミノ酸残基数121個、165個、189個又は206個の4種類のVEGF/VPFサブタイプの何れに対する抗体であってもよく、好ましくは抗VEGF/VPFモノクローナル抗体が挙げられ、特に、該抗VEGF/VPFモノクローナル抗体が、VEGF/VPFのアミノ酸配列の一部である下記配列1～3:

1. KPSCVPLMR
2. SFLQHNKCECRP
3. KCECRPKKDRAR

の少なくとも1つと反応する抗体がであることが好ましい。

【0009】上記の抗VEGF/VPF抗体としては、マウス抗体等もあげられるが、ヒトへの投与において副

作用を軽減するための処理を行ったものも使用することができる。例えば、マウスモノクローナル抗体をポリエチレングリコールのような物質で化学修飾を行い、抗原性を軽減させたもの、また、マウスモノクローナル抗体の可変領域を残して他の部分をヒトの抗体に変換させたマウス・ヒトキメラ抗体や、マウスモノクローナル抗体の抗原との結合領域であるCDR領域を残して他の領域をヒト抗体に抗原との結合力を保持させたまま置き換えたヒト化抗体も使用することができる。さらに、これらを酵素的に切断して低分子化した抗体も使用することができる。該キメラ抗体またはヒト化抗体としては、IgGタイプ又はIgAタイプ等があげられ、該IgGのイソタイプとしては、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4があげられる。

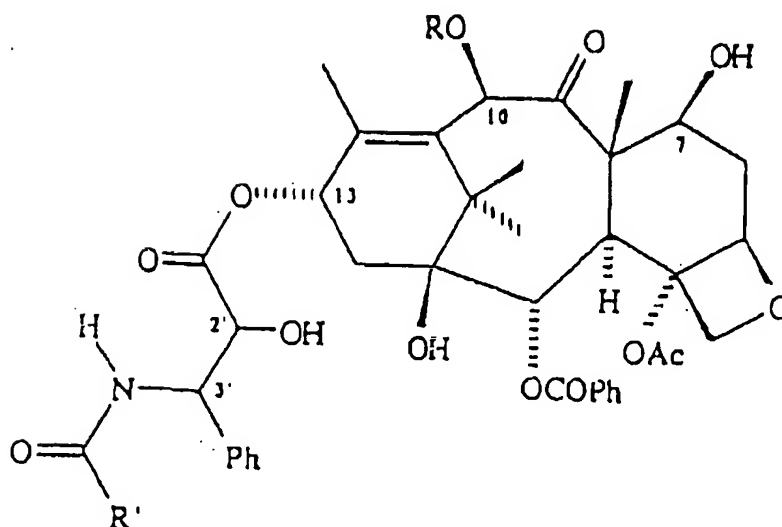
【0010】ポリクローナル抗体はヒト前骨髄性白血病細胞HL-60等より単離しVEGF/VPFのcDNAを大腸菌の中でグルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合蛋白として発現させ、得られた蛋白質を抗原として得ることができる。抗体は、常法に従い、該抗原によりウサギを免疫し、抗体価の上昇した血清からクロマトグラフィーで分画することにより得られる。また、モノクローナル抗体は動物をVEGF/VPFで免疫し脾細胞を取り出しこれをミエロマ細胞とを融合して得たハイブリドーマ細胞を培養することにより製造することができる。このハイブリドーマの製造は例えばKohlerとMilsteinの方法[Nature, 256:495(1975)]等により行うことができる。

【0011】タキサン系化合物

タキサン系化合物とは、太平洋イチイや欧州イチイから抽出される、タキソール(Taxol)およびその誘導体を示し、下記構造式で示されるものであり、すでにその一種ドセタキセル(Docetaxel)が制癌剤として市販されているものである。

【0012】

【化1】



【0013】上記式においてRがアセチル基、R' がフェニル基のときがタキソールであり、Rが水素原子、R' が $\alpha$ -ブトキシ基のときがドセタキセルである。

【0014】本発明の制癌剤を投与する場合、投与する対象は特に限定されない。例えば、個々の血管形成性疾患の予防或いは治療を特異目的として局所又は全身投与することができる。投与する方法は経口又は非経口でもよく、経口投与には舌下投与を包含する。非経口投与には注射例えば皮下、筋肉、血管内、腹腔内又は胸腔内などへの注射、点滴、座剤等を含む。又、その投与量および有効成分の割合は動物か人間かによって、又年齢、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変えることができる。この場合VEGF/VPFアンタゴニスト及びタキサン系化合物の有効量と適切な希釈剤および薬学的に使用し得る担体の組成物として投与される有効量は0.1~100mg/kg体重/日であり1日1回から数回に分けて毎日又は数日に1回又は1~2週間に1回投与される。VEGF/VPFアンタゴニストとタキサン系化合物は、任意の割合で併用することができ、両者は混合した状態で、又は、別々の状態で併用することも可能である。

【0015】本発明の血管新生阻害剤を非経口投与する場合には、安定剤・緩衝剤・保存剤・膨張化剤等の添加剤を含有し通常単位投与量アンプル若しくは多投与量容器又はチューブの状態を提供される。たとえば、注射用製剤は、精製されたVEGF/VPFアンタゴニスト及び/又はタキサン系化合物を溶剤、たとえば、生理食塩水、緩衝液などに溶解し、それに、吸着防止剤、たとえば、Tween80、ゼラチン、ヒト血清アルブミン(HSA)などを加えたものであり、または、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては例えばマンニトール、ブドウ糖などの糖アルコールや糖類を使用することができる。同様に、点眼液、点眼軟膏、乳化剤等の形態とした

り、滞留を延長させるためにリポソームやマイクロスフェアにして使用することも出来る。

【0016】また経口投与する場合はそれに適用される錠剤・顆粒剤・細粒剤・散剤・カプセル剤等は通常それらの組成物中に製剤一般に使用される結合剤・包含剤・賦形剤・滑沢剤・崩壊剤・湿潤剤のような添加剤を含有する。又、経口用液体製剤としては内用水剤・懸濁剤・乳剤・シロップ剤等いずれでの状態であってもよく、又、使用する際に再溶解させる乾燥生成物であっても良い。更にその組成物は添加剤・保存剤の何れを含有しても良い。

【0017】

【実施例】以下実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

(1) VEGF/VPFモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製単離したヒトVEGF/VPF cDNAにて形質転換した酵母の培養液よりヒトVEGF/VPFを精製し(YVPF; 特開平7-31496号参照)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)とグルタルアルデヒドを用いて複合体を作製し、得られた蛋白を抗原として常法に従ってマウスモノクローナル抗体を作製した。即ち、KLH-YVPFで免疫したマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞(Sp2/0-Ag14)をポリエチレングリコール存在下で細胞融合させた。得られたハイブリドーマは限界希釈法によりクローニングした。YVPFとクローン化したハイブリドーマの培養上清の反応性を酵素免疫測定法により調べ、YVPFと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択した。又、このハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体をMV833と命名した。なお得られたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5669として寄託されている。

【0018】(2) VEGF/VPFモノクローナル抗体の調製

選択したハイブリドーマをヌードマウスの腹腔内に移植し、モノクローナル抗体を大量に含む腹水を採取した。この腹水中からプロテインGアフィニティークラム(M AbTrap GII, ファルマシア社製)を用いてモノクローナル抗体を精製した。又、抗体のクラスを抗マウス免疫グロブリンサブクラス特異的抗体を用いた酵素免疫測定法により調べた結果、MV833抗体のクラスはIgG1であった。又、下記の方法で測定したVEGF/VPF121及びVEGF/VPF165に対する解離定数は以下の通りであり本発明のモノクローナル抗体はVEGF/VPFに対して強い親和性を有することがわかる。

○  $5.7 \times 10^{-11} \text{ M} \pm 0.35 \times 10^{-11} \text{ M}$  (VEGF/VPF121)

○  $1.10 \times 10^{-10} \text{ M} \pm 0.11 \times 10^{-10} \text{ M}$  (VEGF/VPF165)

解離定数の測定方法

モノクローナル抗体を0.1 M塩化ナトリウムを含む25 mM炭酸緩衝液(pH=9.0)で2  $\mu\text{g/ml}$ に調製し取り外し可能な有穴プレートに100  $\mu\text{l}$ ずつ添加し4℃で一晩放置する。次に穴から溶液を除き1%BSA-PBSを30  $\mu\text{l}$ ずつ添加し37℃で4時間放置する。1%BSA-PBSを取り除いた後0.1%BSA-PBSで調製したVPFと<sup>125</sup>I標識VPF(<sup>125</sup>I標識VPF121はYVPFをクロラミンT法により標識、<sup>125</sup>I標識VPF165はアマシャム社より購入)反応混液を穴あたり200  $\mu\text{l}$ 添加して一晩放置する。この反応混液中のVPF濃度はVPF121が0~1 ng/穴、VPF165が0~10 ng/穴、<sup>125</sup>I標識VPFが $1 \times 10^4$  cpm/穴(<sup>125</sup>I標識VPF121: 66.7 pg/穴、<sup>125</sup>I標識VPF165: 116 pg/穴)とする。穴から反応混液を取り除き0.1%BSA-PBSで6回洗浄した後、穴を1個ずつ切り離して分析用チューブに入れガンマカウンターにてカウントしその結果から作成した散布図から解離定数を求める。又、下記の方法で測定した本発明のモノクローナル抗体の等電点(pI)は5.2~5.5であった。現時点で報告のある他のIgG1タイプの抗VPFモノクローナル抗体の等電点は我々の報告しているMV101がpI=7.

0~7.5でありジェネンテック社のA4.6.1がpI=4.2~5.2[Kim, K.J. et al. Growth Factors, 7:53 (1992)]であり本発明の物質はいずれの物質とも異なる物質である。

等電点の測定方法

モノクローナル抗体の等電点電気泳動は市販の等電点電気泳動用アガロースゲル(和科盛社)を使用し同社の等電点電気泳動層にて泳動した。泳動は等電力出力可能なパワーサプライ(バイオラド社)により3 Wで30分間泳動した。泳動後ゲルは銀染色キット(バイオラド社)にて蛋白染色した。モノクローナル抗体の等電点は同時に泳動した等電点マーカー蛋白の泳動度より抗体の等電点を求めた。

【0019】(5) VEGF/VPF中のモノクローナル抗体の反応部位の同定

(a) VEGF/VPFのアミノ酸配列の一部分に相当するペプチドの作製ヒトVEGF/VPF121のアミノ配列の連続した12個のアミノ酸を1つのペプチドとして全配列を網羅する67種のペプチドを考案し、各ペプチドをマルチピンペプチド合成法(Maeji, N.J. et al. J. Immunol. method, 134:23(1990))により合成した。まず96穴アッセイプレート用ピンブロックのピンの先端に導入された9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)- $\beta$ -アラニンからピペリジンによりFmoc基を除去した後、ジシクロヘキシルボジイミドとヒドロキシベンゾトリアゾール存在下でFmoc-アミノ酸を縮合させた。N,N-ジメチルホルムアミドで洗浄後、再びジシクロヘキシルボジイミドとヒドロキシベンゾトリアゾール存在下でFmoc-アミノ酸を縮合させ、この操作を繰り返すことにより目的のペプチドを合成した。縮合反応終了後、無水酢酸でアセチル化を行い、さらにトリフルオロ酢酸で側鎖保護基を除去した。ピン上で合成したペプチドはピンを中性溶液中に浸すことにより切り出した。合成したペプチドの定量はオルトフタルアルデヒドを用いてアミノ基を定量することにより行った。合成した67種のペプチドのアミノ酸配列を表1に示した。数字はペプチド識別番号を示す。

【0020】

【表1】

1. APMAEGGGQNNH	24. QEYPDIEYIFK	47. VPTEESNITMQI
2. MAEGGGQNNHEV	25. EYPDIEYIFKP	48. TEESNITMQIMR
3. EGGGQNNHEVVK	26. YPDIEYIFKPS	49. ESNITMQINRIK
4. GGQNNHEVVKFM	27. PDEIEYIFKPSC	50. NITMQIMRIKPH
5. QNNHEVVKFMDV	28. DEIEYIFKPSCV	51. TMQIMRIKPHQG
6. HHEVVKFMDVYQ	29. EIEYIFKPSCVP	52. QIMRIKPHQGQH
7. EVVKFMDVYQRS	30. IEYIFKPSCVPL	53. MRIKPHQGQHIG
8. VKFMDVYQRSYC	31. YIFKPSCVPLMR	54. IKPHQGQHIGEM
9. FMDVYQRSYCHP	32. FKPSCVPLMRG	55. PHQGQHIGEMSF
10. MDVYQRSYCHPI	33. KPSCVPLMRGCG	56. QGQHIGEMSFLQ
11. DVYQRSYCHPIE	34. SCVPLMRGCGCC	57. QHIGEMSFLQHN
12. VYQRSYCHPIET	35. CVPLMRGCGCCN	58. IGEMSFLQHNC
13. YQRSYCHPIETL	36. VPLMRGCGCCND	59. EMSFLQHNCCEC
14. QRSYCHPIETLV	37. LMRGCGCCNDEG	60. SFLQHNCCECRP
15. RSYCHPIETLVD	38. MRCGCGCCNDEGL	61. LQHNCCECRPKK
16. SYCHPIETLVDI	39. RCGGCGCCNDEGLE	62. HNKCECRPKKDR
17. YCHPIETLVDF	40. CGGCGCCNDEGLEC	63. KCECRPKKDRAR
18. HPIETLVDFQ	41. GCCNDEGLECV	64. ECRPKKDRARQE
19. IETLVDFQYEP	42. CNDEGLECVPT	65. RPKKDRARQEC
20. TLVDIFQEYPDE	43. DEGLECVPTNES	66. KKDRARQECDKP
21. VDIFQEYPDEIE	44. GLECVPTESNI	67. DRARQECDKPRR
22. IFQEYPDEIEYI	45. ECVPTESNITM	
23. FQEYPDEIEYIF	46. CVPTESNITMQ	

【0021】(b) MV833抗体と反応するペプチドの同定

以上のようにして合成した67種のペプチドはヒトVEGF/VPF121の全領域に対応するものである。したがって67種のペプチドとMV833抗体との反応性を調べることにによりMV833抗体がVEGF/VPFのどの部位に反応しているかを明らかにすることができる。そこで酵素免疫測定法により67種のペプチドとMV833抗体との反応性を調べた。96穴NOSプレート(コースター社製)に67種の20 $\mu$ Mペプチド溶液を入れ室温で2時間放置した。0.1%BSA-PBSでプレートの穴を3回洗浄した後、2%BSA-PBSを入れ室温で1時間放置した。2%BSA-PBSを除いた後、MV833(1%BSA-PBS溶液)を入れ室温で1時間放置した。0.1%BSA-PBSで6回洗浄後ペルオキシダーゼ標識したヒツジ抗マウスIgG(アマシャム社)(0.

1%BSA-PBS溶液)を入れ室温で1時間放置した。0.1%BSA-PBSで6回洗浄後8.3mg/mlオルトフェニレンジアミン2塩酸塩および0.01%過酸化水素を含む0.2Mトリスクエン酸緩衝液(pH=5.2)を入れて発色させた。反応は2規定硫酸を加えて停止させた後、吸光度(OD490/650)を測定した。なお、反応性の測定には、上記のような酵素免疫測定法の他、オクタロニー法、ウエスタンブロッティング法等を用いてもよい。

【0022】MV833抗体は67種類のペプチドの中でペプチド識別番号31、32、33、60、63の5つのペプチドに強く反応した。ペプチド識別番号31~33のペプチドにはKPSCVPLMRという配列が共通に含まれていることより、この領域ではMV833抗体はKPSCVPLMRというアミノ酸配列部分と反応していると考えられる。したがって、MV833抗体はVEG

F/VPFのKPSCVPLMR配列とSFLQHNKCECRP配列とKCECRPKKDRAR配列とに反応していることが予想される。抗体はタンパク質の表面に露出している部分を認識すると考えられるため、この2種類のアミノ酸配列部分はVEGF/VPFの表面に露出している部分であると言える。又、モノクローナル抗体は抗原決定基が単一であると言われているが、高次構造をとっている蛋白質などの高分子物質が抗原の場合は抗体が立体的に抗原を認識し、蛋白質の一次構造レベルで抗体の反応性を調べた時に二箇所以上の不連続なアミノ酸配列に反応することがある。MV833抗体がVPF中の二箇所のアミノ酸配列部分に反応したことより、本抗体は二箇所のアミノ酸配列部分を立体的に同時に認識していると考えられる。

#### 【0023】(6) 抗腫瘍試験

① 抗腫瘍試験ヌードマウス皮下にて継代したヒト線維肉腫(HT-1080)を2mm角に切り出し、別の1群6匹のヌードマウス皮下にトロアカルを用いて移植した。移植翌日よりおよび5日後にタキソールを10mg/kg尾静脈より2回投与した。抗体は移植翌日から12.5μg/マウスを4日毎に尾静脈投与した。経時的に腫瘍径を測定することで腫瘍体積を算出した。その結果を図1に示す。

② ヌードマウス皮下にて継代したヒト乳癌(MX-1)を2mm角に切り出し、別の一群6匹のヌードマウス皮下にトロアカルを用いて移植した。移植20日後および24日後にタキソールを20mg/kg尾静脈より2回投与した。抗体は、移植20, 24, 28, 32, 36日後に100μg/マウスを5回尾静脈投与した。経時的に腫瘍径を測定することで腫瘍体積を算出した。その結果を図2に示す。図1中、□はコントロール(非投与)、○はタキソール単独、○は抗体単独、△は抗体とタキソールを併用したものを示し、横軸は移植後の日数、縦軸は腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)を示す。図2中、□はコン

トロール(非投与)、○は抗体単独、○はタキソール単独、△は、抗体とタキソールを併用したものを示し、横軸は移植後の日数、縦軸は腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)を示す。図から明らかなようにタキソールと抗体を併用した群ではそれぞれ単独で投与した群より抗腫瘍活性が強く、特にヒト乳癌(MX-1)の系においては、抗体最終投与から30日を経過した時点で6例中5例の腫瘍が消失し治癒と判断された。タキソール単独投与でも腫瘍の退縮は観察されたが全例再増殖していた。

#### 【0024】

【発明の効果】本発明は、VEGF/VPFの機能阻害剤からなる腫瘍抑制剤の奏する効果をさらに向上するものであり、優れた制癌剤を提供できるものである。

#### 【0025】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：タンパク質

起源：

セルライン：

配列：

Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg

1

5

10

配列番号：2

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：タンパク質

起源：

セルライン：

配列：

Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro

1

5

10

配列番号：3

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：タンパク質

起源：

セルライン：

配列：

Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg

1

5

10

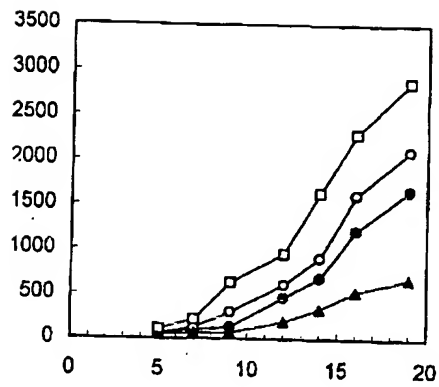
【図面の簡単な説明】

【図1】VEGF/VPFモノクローナル抗体とタキソールの併用によるヒト線維肉腫系における腫瘍体積の変化を示す図である。

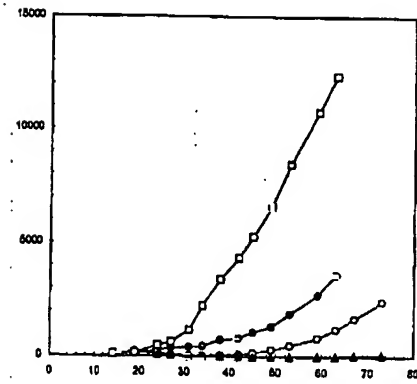
【図2】VEGF/VPFモノクローナル抗体とタキソールの併用によるヒト乳癌系における腫瘍体積の変化を示す図である。



【図1】



【図2】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31  
4C084 AA02 BA01 BA08 BA17 BA18  
BA23 MA02 NA14 ZB261  
ZB262 ZC411 ZC412 ZC752  
4C085 AA14 CC17 DD33 EE03 GG02  
GG03 GG04 GG06 GG08  
4C086 AA01 AA02 BA02 MA02 MA04  
NA14 ZB26 ZC41 ZC75